

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE SS EN LA DIFERENCIACIÓN NEURAL DE  
CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES AISLADAS DE MÉDULA OSEA DE  
RATÓN**

**DIANA KATHERINE GARZÓN PERDOMO**

**Trabajo de grado como requisito parcial para optar al título de  
Biólogo**

**Director**

**LILIANA FRANCIS TURNER**

**PhD**

**Co-director**

**LINA MARIA DE LOS REYES**

**Magister en ciencias biológicas**

**UNIVERSIDAD DEL TOLIMA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**PROGRAMA DE BIOLOGÍA**

**IBAGUÉ-TOLIMA**

**2018**



FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TRABAJO DE GRADO

TÍTULO EVALUACIÓN DEL EFECTO DE SS EN LA DIFERENCIACIÓN  
NEURAL DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES AISLADAS DE MÉDULA  
OSEA DE RATÓN

AUTORES Diana Katherine Garzón Perdomo (070100462011)

DIRECTOR Liliana Francis Turner  
CO-DIRECTOR

JURADOS Angélica María Sabogal Guaqueta (University of Groningen)  
Leonardo Bonilla (Universidad de Antioquia)

CALIFICACIÓN 4.8 (cuatro ocho)

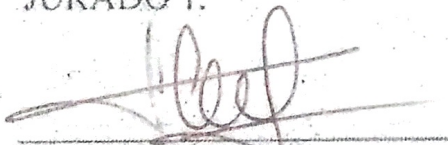
☒ APROBADO

☐ REPROBADO

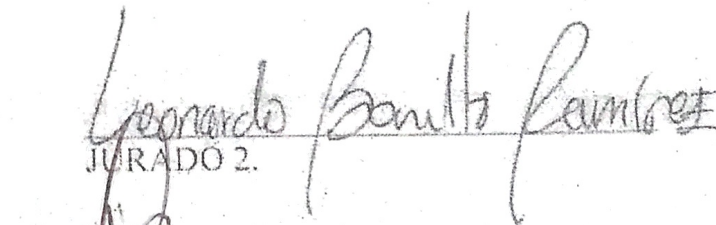

OBSERVACIONES

FIRMAS

JURADO 1.

  
Director del trabajo

JURADO 2.

  
  
Director del Programa (Ad hoc)

Ciudad y fecha: Ibagué, 21 de febrero de 2018



**FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA**

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TRABAJO DE GRADO**

**TÍTULO EVALUACIÓN DEL EFECTO DE SS EN LA DIFERENCIACIÓN  
NEURAL DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES AISLADAS DE MÉDULA  
OSEA DE RATÓN**

**AUTORES** Diana Katherine Garzón Perdomo (070100462011)

**DIRECTOR** Liliana Francis Turner  
**CO-DIRECTOR**

**JURADOS** Angélica María Sabogal Guaqueta (University of Groningen)  
Leonardo Bonilla (Universidad de Antioquia)

**CALIFICACIÓN** 4.8 (Cuatro. ocho).

☒ **APROBADO**

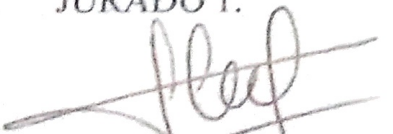
☐ **REPROBADO**

**OBSERVACIONES** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_


**FIRMAS**

Angélica M<sup>a</sup> Sabogal

**JURADO 1.**

  
\_\_\_\_\_  
Director del trabajo

**JURADO 2.**

  
\_\_\_\_\_  
Director del Programa (Ad hoc)

**Ciudad y fecha:** Ibague, 21 de febrero de 2018

"Es bueno amar tanto como se pueda, porque ahí radica la verdadera fuerza, y el que mucho ama realiza grandes cosas y se siente capaz, y lo que se hace por amor está bien hecho."

- Vincent Van Gogh.

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicar está a mis padres, quienes han sido un apoyo en todos los aspectos de mi vida. También, dedico esta tesis a mi segunda madre Anita, quien ya falleció y siempre quiso que su niña fuera una profesional.

## **AGRADECIMIENTOS**

Expreso mis agradecimientos:

A Dios por permitirme haber llegado hasta aquí, por su amor incondicional y misericordia.

A mis padres por ser los mejores del mundo y por estar para mí en los buenos y malos momentos.

A mis tutoras, Lina María de los Reyes por su gran apoyo, por ayudarme cuando más la necesité, por ser una amiga y por compartir conmigo todo su conocimiento. A Liliana Francis Turner, gracias por todo el conocimiento transmitido y por enseñarme que no es suficiente ser una buena investigadora y profesora, sí no eres una persona excepcional. A las dos quiero decirles que son mi inspiración a nivel académico y profesional.

A el doctor Olimpo José García por haberme ayudado para la ejecución de la primera parte de este trabajo y por abrirme las puertas del Laboratorio de Química de la Universidad de Ibagué.

A mi novio, Cristian Betancourt Villamil, por estos 5 años de apoyo, por acompañarme y animarme cuando más lo necesité.

A mis amigas de lucha Andrea Catalina Rubio Vargas y Laura Alejandra Lozano Trujillo por haber compartido conmigo todo este proceso, por crecer a mi lado a nivel académico y personal.

A todos los integrantes del Grupo de Investigación Modelos Experimentales Para Las Ciencias Zoohumanas por la colaboración y por los momentos académicos compartidos.

A EOCYT, por la financiación de este proyecto.

## CONTENIDO

	Pág.
<b>INTRODUCCIÓN</b>	16
<b>1. OBJETIVOS</b>	18
1.1. OBJETIVO GENERAL	18
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	19
2.1. ANTECEDENTES	1
2.2. CÉLULAS MADRE	21
2.3. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES	22
2.3.1. Características de células madre mesenquimales	23
2.3.2. Fuentes de obtención	23
2.4. DIFERENCIACIÓN CELULAR	24
2.4.1. Definición	24
2.4.2. Transdiferenciación y dediferenciación	24
2.5. METODOLOGÍAS UTILIZADAS PARA DIFERENCIAR CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES A LINAJE NEURONAL	25
2.5.1. Diferenciación neuronal utilizando compuestos químicos	25
2.5.2. Diferenciación neuronal utilizando factores neurotróficos	26
2.5.3. Diferenciación neuronal utilizando extractos de planta	26
2.6. GÉNERO SALVIA	27
2.6.1. Género salvia y el sistema nervioso central	27
2.6.2. Metabolitos secundarios de las plantas de género Salvia	28
2.6.3. Principales metabolitos secundarios en las planta Salvia	29
2.7. SS	32
2.7.1. Definición	32
2.7.2. Propiedades medicinales	32



<b>3. METODOLOGÍA</b>	<b>33</b>
3.1. COLECTA DE SS	34
3.2. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO	34
3.3. ESTUDIO CUALITATIVO DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN SS	35
3.3.1. Reconocimiento de alcaloides	35
3.3.2. Reconocimiento de esteroides y/o triterpenoides	36
3.3.3. Reconocimiento de saponinas	36
3.3.4. Reconocimiento de compuestos fenólicos	36
3.3.5. Reconocimiento de taninos	36
3.3.6. Reconocimiento de flavonoides	36
3.3.7. Reconocimiento de leucoantocianidinas	37
3.3.8. Reconocimiento de quinonas	37
3.3.9. Reconocimiento de antocianinas	37
3.3.10. Reconocimiento de cumarinas	37
3.4. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	38
3.5. AISLAMIENTO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE RATÓN	38
3.6. EXPANSIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE RATÓN	39
3.7. DIFERENCIACIÓN NEURAL CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES	40
3.8. INMUNOFLUORESCENCIA	42
3.9. ANÁLISIS MORFOLÓGICO	43
3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	43
 <b>4. RESULTADOS</b>	 <b>45</b>
4.1. COMPUESTOS PRESENTES EN SS	45
4.1.1. Reconocimiento de alcaloides	45
4.1.2. Reconocimiento de esteroides y/o triterpenoides	45
4.1.3. Reconocimiento de saponinas	46
4.1.4. Reconocimiento de compuestos fenólicos	47
4.1.5. Reconocimiento de taninos	47
4.1.6. Reconocimiento de flavonoides	48

<b>4.1.7. Reconocimiento de leucoantocianidinas</b>	<b>48</b>
<b>4.1.8. Reconocimiento de quinonas</b>	<b>48</b>
<b>4.1.9. Reconocimiento de antocianinas</b>	<b>48</b>
<b>4.1.10. Reconocimiento de cumarinas</b>	<b>49</b>
<b>4.2. EXPANSIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE RATÓN</b>	<b>49</b>
<b>4.3. DIFERENCIACIÓN NEURAL DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES</b>	<b>50</b>
<b>4.4. INMUNOFLUORESCENCIA</b>	<b>51</b>
<b>4.5. ANÁLISIS MORFOLÓGICO</b>	<b>54</b>
<b>4.5.1. Perímetro celular</b>	<b>55</b>
<b>4.5.2. Área celular</b>	<b>56</b>
<b>4.5.3. Número de neuritas</b>	<b>57</b>
<b>4.5.4. Tamaño de neuritas</b>	<b>58</b>
 <b>5. DISCUSIÓN</b>	 <b>59</b>
<b>5.1 COMPUESTOS PRESENTES EN SS</b>	<b>59</b>
<b>5.2. DIFERENCIACIÓN DE CMM</b>	<b>60</b>
 <b>6. CONCLUSIONES</b>	 <b>64</b>
 <b>RECOMENDACIONES</b>	 <b>65</b>
 <b>REFERENCIAS</b>	 <b>66</b>
 <b>ANEXOS</b>	 <b>80</b>

## LISTA DE TABLAS

	Pág
<b>Tabla 1.</b> Grupos experimentales utilizados para evaluar el efecto de las partes de la especie SS en la diferenciación neural de células madre mesenquimales	42
<b>Tabla 2.</b> Características del análisis estadístico	44
<b>Tabla 3.</b> Metabolitos secundarios presentes o ausentes en las partes de la especie SS	45

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág</b>
<b>Figura 1.</b> Clasificación de células madre según su estado evolutivo y su potencial de diferenciación	22
<b>Figura 2.</b> Metodología general utilizada para evaluar el efecto de SS sobre la diferenciación de células madre mesenquimales	33
<b>Figura 3.</b> Colecta de la especie SS	34
<b>Figura 4.</b> Concentración de los extractos etanólicos de SS por rotaevaporación	35
<b>Figura 5.</b> Pasos para el aislamiento de CMM de la MO de ratón.	39
<b>Figura 6.</b> Diseño experimental del aislamiento, mantenimiento y diferenciación de CMM	41
<b>Figura 7.</b> Reconocimiento de esteroides y/o triterpenoides en las partes de la especie SS.	46
<b>Figura 8.</b> Reconocimiento de saponinas en las partes de la especie SS.	47
<b>Figura 9.</b> Reconocimiento de fenoles en las partes de la especie SS.	47
<b>Figura 10.</b> Reconocimiento de antocianinas en las partes de la especie SS.	49
<b>Figura 11.</b> Reconocimiento de cumarinas en las partes de la especie SS.	49
<b>Figura 12.</b> Células madre mesenquimales aisladas de médula ósea de ratón	50
<b>Figura 13.</b> Morfología de células 7 días después de ser o no tratadas con el extracto de la especie SS	51
<b>Figura 14.</b> Inmunofluorescencia de células tratadas con y sin la especie de planta SS.	52
<b>Figura 15.</b> Inmunofluorescencia de células tratadas y no tratadas con los extractos de la especie SS.	53
<b>Figura 16.</b> Morfología de las células tratadas y no tratadas con los extractos de SS	54
<b>Figura 17.</b> Morfología de células del grupo control y de las tratadas con P1C1 y P1C2	54
<b>Figura 18.</b> Perímetro celular de células tratadas y no tratadas con los extractos de SS	55

<b>Figura 19.</b> Área de las células tratadas y no tratadas con los extractos de SS	56
<b>Figura 20.</b> Número de prolongaciones en las células después de ser tratadas con los extractos de la especie SS	57
<b>Figura 21.</b> Longitud neurítica de las células tratadas y no tratada con los extractos de la especie SS	58

## LISTA DE ANEXOS

	Pág
<b>Anexo A.</b> Mantenimiento de una colonia de ratas y ratones en el Bioterio de Experimentación Animal de la Universidad del Tolima- PNT	81
<b>Anexo B.</b> Análisis estadístico	88

## LISTA DE ABREVIATURAS

**CMM:** Células Madre Mesenquimales  
**CM:** Células Madre  
**EP:** Enfermedad de Parkinson  
**ELA:** Esclerosis Lateral Amiotrófica  
**EA:** Enfermedad de Alzheimer  
**BME:** B- Mercaptoetanol  
**BHA:** Hidroxianisol Butilado  
**DMSO:** Dimetilsulfóxido  
**IBMX:** Indometacina/3-isobutil-1-metilxantina  
**bFGF:** Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico  
**BDNF:** Factor de Crecimiento derivado del cerebro  
**MO:** Médula ósea  
**CME:** Células Madre Embrionarias  
**ATRA:** Tretinoína  
**NGF:** Factor de Crecimiento Nervioso  
**LIF:** Factor Inhibidor de Leucemia  
**IGF-1:** Factor de Crecimiento Insulinico  
**SNC:** Sistema Nervioso Central  
**MPP+:** 1-metil-4-fenilpiridnio  
**DMEM:** Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium  
**SFB:** Suero Fetal Bovino  
**PSA:** Penicilina/Estreptomicina/Anfotericina  
**PBS:** Buffer Fosfato Salino  
**PB:** Buffer Fosfato  
**DAPI:** 4 ',6-diamino-2-fenilindol